

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370060

研究課題名（和文） 桿体と錐体とを特徴づける分子基盤

研究課題名（英文） Molecular bases characterizing rods and cones

研究代表者

河村 悟 (KAWAMURA SATORU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：80138122

研究成果の概要（和文）：視細胞には桿体と錐体とがあつて、桿体は光感度が高く、錐体は低い。従つて、光の少ない暗い所では桿体が、また、光が充分ある明るい所では錐体が働く。桿体と錐体とでは様々な点で違いが見られ、特に光応答には特性に違いがあり、そのため、暗い所と明るい所とでは見え方に違いがある。本研究ではその見え方に違いをもたらす分子基盤、つまり、桿体と錐体とで光応答の特性の違いをもたらす分子基盤、および、それらの機能を維持する上で不可欠な諸反応の分子基盤について研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Our visual sensation relies on two types of photoreceptors, rods and cones. Rods are highly light-sensitive so that they mediate night vision. Cones are less light-sensitive, and they mediate daylight vision. Rods and cones are different in many aspects. One of the differences is seen in the light response characteristics. Due to this difference, our way of seeing is different at night and daylight. In the present study, we examined the molecular bases of the differences between rods and cones.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	2,0410,000

研究分野：分子感覚生理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：視細胞、桿体、錐体、光応答、光感度、時間分解能、光一電位変換機構

1. 研究開始当初の背景

桿体と錐体とでは光に対する感度と光応答の時間経過が異なること、すなわち、光感度は桿体で高く錐体で低いこと、および、応答の時間経過は桿体では緩慢で錐体では迅速であること、つまり、光応答の時間分解能は桿体で低く錐体が高いことが知られている。視細胞での光応答発生機構は桿体について既に研究が行われており、その詳細が定量的に明らかとなっている。錐体でも、完全に同一ではないが類似の機構が存在している

ことが断片的な研究によって明らかになっていた。

私達はこのような状況のもとで、錐体での光応答の発生メカニズムを桿体での研究レベル、すなわち、定量的なレベルで明らかにしたいと考えた。そこで、それまでは誰も成功していなかった、錐体の大量精製を試みた。

幸いに、世界ではじめて、魚類のコイを使って錐体の大量精製に成功した（2001年）。以後、錐体での光応答発生機構の幾つかの反応について、定量的な測定を試み、私達自身

で行った桿体での実験結果と比較し、これらの反応が桿体と錐体とでどのように異なっているか、また、異なっているとすればどれだけ異なり、それが桿体と錐体の光応答の特性の違いを説明しうるか、また、異なっているのはどの様な分子レベルでの違いに基づくのか、例えば、反応に与る蛋白質の1分子当たりの活性がどの様に違い、その蛋白質の発現量がどの様に異なっているか、などの研究を行ってきた。

本研究の開始当初、私達自身の研究によって、(1) 錐体では桿体と比べて視物質がトランスデュースンを活性化する効率が低いこと (>1/30 倍)、(2) 活性化されたトランスデュースンが cGMP ホスホジエステラーゼを活性化する効率が錐体では低いこと (~1/10 倍)、(3) 活性化された視物質が不活性化される反応である視物質のリン酸反応が錐体では非常に早いこと (~100 倍) が明らかとなっていた。

そこで本研究ではこれらの反応以外で光応答発生機構を構成する各反応について反応の効率を桿体と錐体とで比べた。また、桿体と錐体の機能を維持する上で不可欠と考えられる諸反応について、両者での違いを検討した。

2. 研究の目的

本研究では以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) 錐体で活性型視物質によるトランスデュースンの活性化効率が低い理由
- (2) 錐体で活性型トランスデュースンによる cGMP ホスホジエステラーゼの活性化効率が低い理由
- (3) 錐体での活性化されたトランスデュースンの寿命の測定
- (4) 桿体と錐体とでの cGMP 合成酵素の活性の比較
- (5) 桿体と錐体とでのレチナル還元酵素の活性の比較
- (6) 錐体に特異的に発現している蛋白質、遺伝子の同定と機能解析

3. 研究の方法

上記、(1)~(5) については精製した錐体を用い、生化学的な方法によって各蛋白質の活性を測定した。(6) については、分子遺伝学的方法によって錐体特異的な遺伝子の同定を行った。また、生化学的な方法で明らかとなった錐体特異的蛋白質については細胞生物学的な手法によって研究を遂行した。

4. 研究成果

(1) これまでの測定では錐体でのトランスデュースンの活性化が非常に短時間 (2-3 秒) で終了することから定量的な測定が実際上

不可能であった。そこで、迅速反応停止装置を使って早い時間経過を測定し、定量的な議論の出来る結果を得た。錐体では桿体よりもトランスデュースンの活性化効率が数倍低いとの結果を得た (投稿準備中)。

(2) 活性化されたトランスデュースンの量を一定にして桿体と錐体とでどれだけかの cGMP ホスホジエステラーゼが活性化されるかを調べた。その結果、同程度の活性化が起こることが判明した。錐体ではこの活性化効率が低いことを想定していたので、予想外の結果であった。現在、その不一致について検討を行っている。おそらく、活性化されたトランスデュースンの寿命が錐体では短く、それが理由で錐体での cGMP ホスホジエステラーゼの活性化の効率が低いのであろうと考えている。

(3) トランスデュースンはそれ自身の持つ GTP アーゼ活性によって GTP を分解し、不活性化する。GTP の分解速度を桿体と錐体とで比べたところ、錐体の方がはるかに早く GTP が分解されること、つまり、活性型トランスデュースンの不活性化は錐体の方がはるかに早いことが明らかになった (投稿準備中)。

(4) 桿体と錐体とで cGMP 合成活性を比べた。その結果、錐体の方が 10 倍も高い活性を示すことが明らかになった。これにより、光刺激の停止後、cGMP が速やかに供給される結果、錐体の応答が素早く暗時のレベルに戻ることが説明できた (図 1 ; 発表論文 3)。

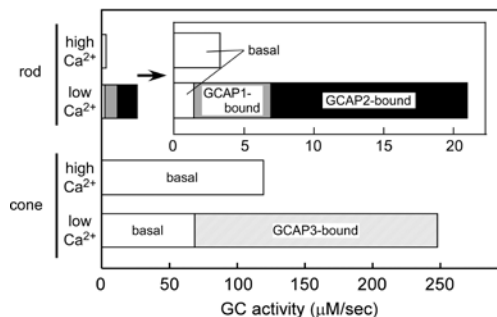


図 1 実測値に基づく桿体と錐体での cGMP 合成活性の予測。発表論文 3 より。

(5) 桿体と錐体とで視物質の再生に不可欠であるオールトランスレチナルの還元活性を比較した。その結果、錐体の方が 30 倍も高いことが明らかになった。このような性質を錐体が備えていることにより、明るい所で機能しなければならない錐体では、視物質の再生を迅速に行うことが可能である。また、

視物質の再生に必須である 11 シスレチナールの供給について、これまでは知られていなかった新たな反応の存在 (AL-OL カップリング反応) が明らかになり (図 2、赤矢印)、この供給系の活性は非常に高いことが示された。錐体での視物質再生系に大きく寄与する反応であろうと考えている。

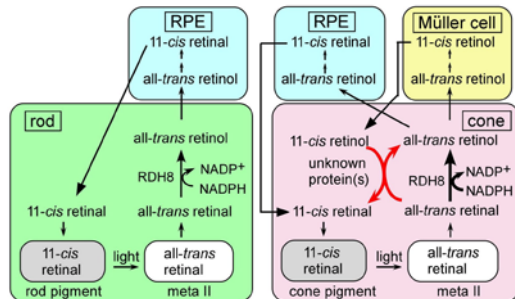


図 2 錐体特異的な 11 シスレチナールの生成反応 (AL-OL カップリング反応; 赤矢印)。発表論文 4 より。

(6) 錐体特異的に発現している遺伝子を数種類同定した (発表論文 6)。これらのうち、幾つかについて、細胞生物学的な手法によって、錐体のどの部位に発現しているかを、また、遺伝子発現を鎖害したときどの様な表現型が得られるかをゼブラフィッシュを使って検討している。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 9 件)

1. Arinobu, D., Tachibanaki, S. and Kawamura, S. (2010) Larger inhibition of visual pigment kinase in cones than in rods. *J. Neurochem.* 115(1): 259-268. 査読有り。
2. Miwa, N., Ogawa, M., Shinmyo, Y., Hiraoka, Y., Takamatsu, K. and Kawamura S. (2010) Dicalcin inhibits fertilization through its binding to a glycoprotein in the egg envelope in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 285(20): 15627-15636. 査読有り。
3. 河村 悟 (2010) GRK による視物質のリン酸化とその制御、*医学のあゆみ*, 233(9): 893-898. 査読無し。
4. Takemoto, N., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2009) High cGMP synthetic activity in carp cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(28): 11788-11793. 査読有り。
5. Miyazono, S., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2008) Highly efficient retinal metabolism in cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(41): 16051-16056. 査読有り。
6. Torisawa, A., Arinobu, D., Tachibanaki, S. and Kawamura, S. (2008) Amino Acid Residues in GRK1/GRK7 Responsible for Interaction with S-modulin/Recoverin. *Photochem. Photobiol.* 84(4): 823-830. 査読有り。
7. Shimauchi-Matsukawa, Y., Aman, Y., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2008) Identification of differentially expressed mRNAs in carp rods and cones. *Mol. Vis.* 14: 358-369. 査読有り。
8. Miwa, N., Uebi, T., and Kawamura, S. S100-Annexin Complexes: Biology of conditional association. (2008) *FEBS J.* 275(20): 4945-4955. 査読有り。
9. Kawamura, S. and Tachibanaki, S. (2008) Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 150 (4): 369-377. 査読有り。

[学会発表] (計 21 件)

1. 瀬野亜希・竹本訓彦・Lalida Sirianant・橘木修志・河村 悟: 2種類の視物質キナーゼ (GRK1、GRK7) の活性の違いをもたらす領域の解析、第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23 日、東京大学 (東京都)。
2. Shuji Tachibanaki, Satoru Kawamura: Molecular mechanisms determining photoreponse characteristics in rod and cone photoreceptor cells、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 21 日、東北大学 (仙台市)。
3. 有信大輔・橘木修志・河村 悟: 錐体における高い視物質リン酸化調節活性、第 14 回視覚科学フォーラム、2010 年 8 月 26 日、筑波大学 (つくば市)。
4. 有信大輔・橘木修志・河村 悟: 錐体と桿体における視物質リン酸化とその制御機構、第 16 回日本光生物学協会年会、2010 年 8 月 11 日、大阪大学 (吹田市)。
5. Satoru Kawamura: Rod and cone photoreceptors: How they differ in detecting light and maintaining the ability to evoke light responses、The 10th AEARU International Molecular and Biotechnology Workshop、2009 年 11 月 13 日、National Taiwan University (Taipei, Taiwan)。
6. Aki Seno, Norihiko Takemoto, Shuji Tachibanaki, Satoru Kawamura: Identification of a region responsible for higher phosphorylation activity of GRK7 than GRK1、第 47 回日本生物物理学会年会、2009 年 10 月 31 日、アスティ徳島 (徳島市)。
7. 増田隆昌・和田恭高・河村 悟: セブラフィッシュ錐体の主要なタンパク質 ES1 のノックダウン解析、第 80 回日本動物学会大会、2009 年 9 月 19 日、静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ (静岡市)。
8. 竹本訓彦・橘木修志・河村 悟: コイ錐体

- 視細胞における高いcGMP合成活性、第80回日本動物学会大会、2009年9月19日、静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ（静岡市）。
9. 橋木修志・越谷祐貴・河村 悟：錐体視細胞でのトランスデュースンとPDEの活性化と不活性化の効率、第13回視覚科学フォーラム、2009年9月3日、鹿児島大学（鹿児島市）。
 10. 瀬野亜希・竹本訓彦・橋木修志・河村 悟：GRK1とGRK7の活性の違いをもたらす領域の特定、第15回日本光生物学協会年会、2009年8月20日、岡崎コンファレンスセンター（岡崎市）。
 11. Norihiko Takemoto, Shuji Tachibanaki, Satoru Kawamura : High cGMP Synthetic Activity in Carp Cones, FASEB Summer Research Conferences: The Biology and Chemistry of Vision, 2009年6月15日, Peter Bedford Ballroom (Snowmass, Colorado, USA).
 12. Sadaharu Miyazono, Shin-ya Sato, Shuji Tachibanaki, Satoru Kawamura : Highly Effective Retinal Metabolism in Carp Cones, FASEB Summer Research Conferences: The Biology and Chemistry of Vision, 2009年6月15日, Peter Bedford Ballroom (Snowmass, Colorado, USA).
 13. 有信大輔・橋木修志・河村 悟：S-モジュリン、s26によるGRK1/GRK7制御機構、第46回日本生物物理学会、2008年12月4日、福岡国際会議場（福岡市）。
 14. 佐藤慎哉・宮園貞治・橋木修志・河村 悟：コイ錐体膜起こるレチナル・レチノール酸化還元共役反応、第46回日本生物物理学会、2008年12月4日、福岡国際会議場（福岡市）。
 15. 竹本訓彦・松川淑恵・橋木修志・河村 悟：錐体における高いcGMP合成活性の生理的意義、第46回日本生物物理学会、2008年12月4日、福岡国際会議場（福岡市）。
 16. 橋木修志・越谷祐貴・河村 悟：錐体特異的なGT活性化と不活性化をもたらす分子基盤、第46回日本生物物理学会、2008年12月4日、福岡国際会議場（福岡市）。
 17. 河村 悟：薄明視と昼間視を特徴づける視細胞の分子メカニズム、第81回日本生化学会年会、2008年12月1日、神戸ポートピアホテル（神戸市）。
 18. 宮園貞治・松川淑恵・橋木修志・河村 悟：コイ錐体視細胞における高いレチノイド代謝活性、第79回日本動物学会大会、2008年9月6日、福岡大学（福岡市）。
 19. 河村 悟：桿体と錐体の光受容機構の違いの分子メカニズム、第79回日本動物学会大会、2008年9月5日、福岡大学（福岡市）。
 20. 橋木修志・松川淑恵・有信大輔・宮園貞治・竹本訓彦・越谷祐貴・瀬野亜希・河村 悟：桿体・錐体の応答の違いを生み出す分子機構、第12回視覚科学フォーラム、2008年8月28日、大阪大学（豊中市）。
 21. 河村 悟・橋木修志・有信大輔・竹本訓彦：錐体電位発現機構、大阪大学蛋白質研究所セミナー「生物における光情報変換の一般性と多様性」、2008年4月19日、大阪大学蛋白質研究所（吹田市）。
- [図書] (計1件)
1. 河村 悟：朝倉書店、視覚の光生物学、2010年10月出版、総ページ212。
- [その他]
- ホームページ：
<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~kawamura/index2.htm>
- 研究教育用ビデオ：
 --網膜での視物質の褪色と再生：
<http://www.youtube.com/watch?v=IfVW2v1Cakb>
 --桿体膜での視物質の褪色と再生：
http://www.youtube.com/watch?v=Ufks_8uBouc
 --吸引電極法と桿体折り取り標本の作成法：
<http://www.youtube.com/watch?v=doYiOloRHQA>
 --明所と暗所とでの色の見え方の違い：
<http://www.youtube.com/watch?v=i4U37Uws4Fs>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
 河村 悟 (KAWAMURA SATORU)
 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
 研究者番号：80138122